Lane Medical Libr

Aus der chirurgischen Universitätsklinik in Heidelberg
(Direktor: Professor Dr. M. Wilms).

ÜBER GEWEBSKULTUREN IN VITRO
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER GEWEBE ERWACHSENER TIERE

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
EINER
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT ZU HEIDELBERG
VORGELEGT VON

ANTON DILGER
AUS FRONT ROYAL.

LEIPZIG
VERLAG VON F. C. W. VOGEL
1913.

Aus der chirurgischen Universitätsklinik in Heidelberg
(Direktor: Professor Dr. M. Wilms).

ÜBER GEWEBSKULTUREN IN VITRO
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER GEWEBE ERWACHSENER TIERE

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER MEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
EINER
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT ZU HEIDELBERG
VORGELEGT VON

ANTON DILGER
AUS FRONT ROYAL.

LEIPZIG
VERLAG VON F. C. W. VOGEL
1913.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Heidelberg.

Referent:
Prof. Dr. Wilms

Dekan:
Prof. Dr. W. Fleiner
Geh. Hofrat

Die Kultur lebender Gewebe in vitro ist durch die Veröffentlichungen Harrisons aus dem Jahre 1907, worin er mitteilte, daß es ihm gelungen sei, embryonales Froschgewebe außerhalb des Körpers zu züchten, zu einer neuen biologischen Forschungsmethode geworden. Zwar hatte schon 10 Jahre vorher Loeb angegeben, daß es ihm geglückt sei, Gewebszellen außerhalb des Organismus zum Wachstum zu bringen, aber Loeb ist uns bis heute noch die Mitteilung seiner Technik sowie das Ergebnis dieser Versuche schuldig geblieben. Das Interesse für diese biologische Methode wurde immer größer, als Burrows und Carrel berichteten, daß es mit ihrer Hilfe möglich sei, das Gewebe von embryonalen Warmblütern außerhalb des Körpers zum Wachstum zu bringen. Noch aussichtsreicher wurde die Methode für die Lösung biologischer Probleme, als man erfuhr, daß die gleichen Autoren nicht nur die Gewebe erwachsener Warmblüter, sondern sogar Tumorstückchen in vitro sich hatten weiter entwickeln sehen. Die schönsten Perspektiven eröffneten sich hier für alle Gebiete medizinischer Forscher.

Fast zwei Jahre sind seit den ersten Veröffentlichungen von Carrel und Burrows vergangen, und man muß sich wundern, wie wenige Forscher im Vergleich zur Wichtigkeit der in Frage stehenden Probleme zu der Methode Stellung genommen haben, denn außer den Arbeiten von Carrel und Burrows, sowie diejenigen ihrer Mitarbeiter, sind bisher nur Hadda, Rosenthal, Braus, Oppel und Jolly vom Collège de France mit Arbeiten über diesen Gegenstand an die Öffentlichkeit getreten.

Dann haben sich noch Prausnitz, Behne und Pfeiffer in Breslau an der Diskussion über den Vortrag von Hadda beteiligt.

Bald nach dem Erscheinen der ersten Arbeiten von Carrel und Burrows wurde auch an der Heidelberger chirurgischen Klinik ein Laboratorium für diese Gewebsstudien eingerichtet. Mit der Assistenz von Dr. Arthur Meyer hat der Verfasser dann Experimente unternommen, welche sich fast ausschließlich mit dem Gewebe erwachsener Tiere beschäftigten. In der folgenden Arbeit soll nun an der Hand der bisher vorliegenden Veröffentlichungen sowie der eigenen Erfahrungen untersucht werden, ob der Beweis erbracht ist, daß die bisher bei den Gewebskulturen in vitro beobachteten Vorgänge als wirkliches Wachstum angesehen werden müssen, d. h. ob sie ein Produkt wirklicher Zellsprossung oder Zellteilung sind, und ob sich alle Elemente des Gewebes, also Epithel wie Bindegewebe, in typischer Weise an dem Vorgang beteiligen, und schließlich ob das Resultat des Wachstums eine organische Formation darstellt.

Technik.

Für die Ausführung der Experimente ist ein gut ausgerüstetes Laboratorium notwendig und für das Gelingen der Experimente ist schnelles Arbeiten mit guter Assistenz und unter den strengsten aseptischen Kautelen erstes Erfordernis. Das Laboratorium soll eine gleichmäßige Temperatur haben und muß möglichst staubfrei sein. Für die Bereitung des für die Kulturen nötigen Nährmediums braucht man eine gute Zentrifuge. Wir ließen uns eine solche von Runge mit elektrischem Betrieb anfertigen, welche bis zu 3000 Umdrehungen in der Minute macht; sie hat Raum für vier Zentrifugengläser. Zur Aufnahme dieser Gläser dienen größere Metalltuben, in welche fein verstoßenes Eis eingebracht wird.

Die fertigen Präparate werden dann in einen Brutofen von 37 Grad gebracht. Entnimmt man die Präparate dem Brutofen zur mikroskopischen Beobachtung, so muß man sie in einen heizbaren Kasten bringen. Wir benützten dazu einen von Zeiß angefertigten. Sehr zweckmäßig ist es, einen Apparat für Mikrophotographie zu besitzen. Leider verfügten wir nicht über einen

solchen und müssen daher auf die Wiedergabe von Mikrophotogrammen verzichten. Versuchsweise ließen wir uns von der Firma Leitz den von Edinger angegebenen Projektionsapparat zur Verfügung stellen. Es war uns aber nicht möglich, den Apparat mit dem heizbaren Objektkasten in zweckmäßiger Weise zu verbinden und die Präparate gingen daher schnell zugrunde, offenbar unter dem Einfluß der starken Belichtung und Erwärmung durch die als Beleuchtung dienende Bogenlampe. Übrigens hat Braus (3) bei seinen Experimenten über Deckglaskulturen vom embryonalen Hühnerherzen Aussetzen und Irregularitäten des Herzschlages unter der Einwirkung chemischer Lichtstrahlen beobachtet. Immerhin gelang uns mit Hilfe dieses Apparates durch kurzes Unterschieben des Präparates in verschiedenen Intervallen jeweils gute Umrisse des projektierten Bildes zu erhalten und durch Vergleich der zu verschiedenen Zeiten gewonnenen Umrisse Verschiebungen an der Peripherie des Präparates festzustellen, ähnlich denen, welche Carrel und Burrows für Milzkulturen (12) abgebildet haben. Photographische Aufnahmen mit dem Apparat gaben unbefriedigende Resultate. Bei der Herstellung der Präparate bedienten wir uns im wesentlichen der von Carrel bzw. Burrows angegebenen Technik. Zunächst wurde in Äthernarkose bei einem Tier der gleichen Spezies, dessen Organe zur Kultur benützt werden sollten, die Carotis freigelegt und das Operationsfeld, nachdem es möglichst abgetrocknet war, mit sterilem Olivenöl übergossen. Die Carotis wurde mit einer kleinen federnden Klemme zentral abgeklemmt und peripher durch eine kleine Incision eine in Olivenöl sterilisierte Glaskanüle eingebunden. Hierauf wurde die Klemme entfernt und das Blut in gut paraffinierte und in eisgekühlte Zentrifugiergläser aufgefangen. Diese wurden mit sterilen Gummikappen verschlossen. Hierauf wurden sie sofort in die mit Eis gefüllten Metalltuben der Zentrifuge gebracht und diese für 10—20 Minuten in Umdrehung versetzt. Gearbeitet wurde mit dem Gewebe ausgetragener Hunde, Kaninchen und Ratten. Die größte Schwierigkeit machte die Gewinnung des Rattenplasmas, da dieses eine außergewöhnlich große Gerinnungstendenz hat. Die Gewinnung des Plasmas bei Hunden und Kaninchen gelang hingegen sehr leicht, und wir konnten das fertige Plasma längere Zeit in ungeronnenem

Zustande aufbewahren. Trotzdem zogen wir es vor, stets frisch bereitetes Plasma zu verwenden. Sowie das Plasma fertig war, wurde das Tier, von dessen Organe Kulturen angelegt werden sollten, narkotisiert und unter aseptischen Kautelen das Organ entnommen. Dieses wurde auf eine Glasplatte, die leicht angewärmt war, aufgelegt und nach Zusatz von etwas Ringerlösung oder von etwas Serum in feinste Stückchen geschnitten. Bei dem Zerschneiden, welches mit einem Kataraktmesser geschah, wurden die Organe möglichst vor Quetschungen bewahrt. Während nun der Operateur die Organstückchen auf die Deckgläschen brachte, setzte der Assistent das Plasma mit Hilfe einer paraffinierten Pipette zu und brachte das Präparat auf den hohl geschliffenen Objektträger, schloß das Deckgläschen ringsum dicht mit Paraffin ab und ließ es dann vom Laboratoriumswärter sofort in den Brutofen bringen.

In einem Punkte erfuhren wir hierbei etwas anderes wie Burrows und Carrel. Da diese ausdrücklich anempfehlen, man solle die Präparate vor jähen Temperaturwechseln schützen, so wunderten wir uns, daß sie gar nichts von dem durch Zusatz des eisgekühlten Plasmas zum Gewebsstück notwendigerweise entstehenden Chok erwähnen. Um diesen Chok zu vermeiden, haben wir das Plasma zuvor immer leicht erwärmt. Obwohl Burrows und Carrel in ihren späteren Veröffentlichungen dem Temperaturwechsel nicht so große Bedeutung beizulegen scheinen, glauben wir es dem Umstande, daß wir das Plasma zuvor erwärmten, zuschreiben zu dürfen, daß wir das von den Autoren angegebene Latenzstadium für Organe erwachsener Tiere durchschnittlich etwas kürzer fanden. Sie sagen, daß dieses Latenzstadium für die Organe Erwachsener häufig 2—3 Tage dauert. Wir konnten schon häufig nach 6 Stunden das Auftreten der sog. Wachstumszone beobachten.

Neben den oben beschriebenen Kulturen, die man als Deckglaskulturen bezeichnet, kann man noch große Glasplattenkulturen anfertigen, sie haben jedoch nur für die makroskopische Beobachtung Wert oder sind nach Fixierung und Einbettung zur Anfertigung von Serienschnitten brauchbar.

Ein anderes Verfahren, um größere Kulturen anzufertigen und um das sich sonst nach einigen Tagen erschöpfende Plasma

zu erneuern, besteht in der Verwendung der bekannten Gabritschewski-Schalen. Die genauere Beschreibung der sehr komplizierten Methode, von der Carrel selbst sagt, daß sie weit davon entfernt sei, eine ideale zu sein, findet sich in der Berl. klin. Wochenschrift 1912.

Zur Herstellung der Kulturen bedient man sich der Gabritschewskischen Schalen und größerer runder Schalen. Wie bekannt, besteht die Gabritschewskische Schale aus einem abgeplatteten und runden Rezipienten und einem Deckel. Der Boden der Schale enthält eine periphere Partie in Gestalt einer Rinne, welche das zum Feuchthalten der Atmosphäre bestimmte Wasser aufnimmt und einen zentralen, erhabenen Teil, in welchem die von der Kultur ausgeschiedenen Flüssigkeiten zurückgehalten werden. Der Deckel ist eine runde Glasplatte, welche an dem Rezipienten mittels Vaselins befestigt wird. Nahe dem Rande, an den Enden ein und desselben Durchmessers sind zwei Löcher gebohrt. Je nachdem diese zwei Löcher zwei ähnlichen Löchern, welche der obere Rand des Rezipienten trägt, entsprechen oder nicht, wird die Atmosphäre der Schale hermetisch abgeschlossen oder steht mit der äußeren Luft in Verbindung. Das Kulturmedium und die Gewebe liegen der unteren Deckelfläche an. Sie bedecken eine Fläche von einem ungefähr 65 mm großen Durchmesser.

Die runden Schalen haben eine weit beträchtlichere Kapazität. Sie bestehen aus einem Rezipienten und einem Glasdeckel. Der Rezipient enthält eine große Petrische Schale, die auf einem Untersatz ruht und die Kulturflüssigkeiten aufnimmt. Der Boden der Schale ist mit Wasser gefüllt. Die Kultur wird direkt auf die untere Seite des Deckels gebracht, wo sie einen Kreis von 15 cm bedecken kann. Wünscht man, daß die Kultur beweglich sei und gewaschen werden könne, dann bringt man sie auf einen Seidenschleier, der über einen viereckigen Glasklotz ausgespannt ist. Der Klotz wird an die untere Deckelseite mit ein wenig Paraffin fixiert. Er kann auch leicht abgenommen und in einem Kristallgefäß gebadet werden, welches Ringersche Lösung enthält.

Die Kulturschalen werden in einem trockenen Ofen sterilisiert. Man präpariert sie sogleich, indem man ihre Rinne oder ihren Boden mit Ringerscher Lösung oder Wasser füllt und ihren oberen

Rand mit Vaselin bestreicht. Auf die Unterfläche des Deckels bringt man die Gewebe und das Kulturmedium.

Mittels einer großen Pipette bringt man auf die Platte die Ringersche Lösung, welche die Gewebsfragmente enthält, und breitet die Flüssigkeit dergestalt auf ihrer Oberfläche aus, daß die Fragmente ungefähr gleichmäßig verteilt sind. Man fügt alsdann das Plasma hinzu in einer drei- bis vierfach größeren Menge als die Lösung, welche die Gewebe in Suspension hält. Während die Gerinnung sich vollzieht, schützt man die Platte gegen den atmosphärischen Staub. Sobald die Konsistenz des Kulturmediums eine genügende ist, befestigt man die Platte an die Schale, an welcher sie durch das Vaselin festhaftet.

Um eine Kultur auf einem Seidenschleier herzustellen, bringt man zunächst den Klotz auf die Platte und fixiert ihn mit Paraffin. Alsdann befeuchtet man die Seide mit Ringerscher Lösung oder Plasma und bringt das Gewebe und das Medium in gewohnter Weise hinein. Will man nach einigen Tagen die Kultur bespülen, so setzt man den Klotz in die kalte Ringersche Lösung. Nach Verlauf von ein oder zwei Stunden nimmt man ihn aus der Ringerschen Lösung heraus, bringt ihn auf eine andere Platte, wo er von neuem mit Paraffin fixiert und mit einem neuen Medium bedeckt wird. Man kann so die Verjüngung großer Kulturen ausführen und ihr Leben verlängern. Aber die bakteriellen Infektionen sind häufiger und gefährlicher für die großen Kulturen als für die kleinen.

Die Schalen werden in einen Ofen gesetzt bei einer Temperatur, die sich der Natur der Gewebe, welche sie enthalten, annähert. Das Wachstum der Gewebe vollzieht sich dort ungefähr auf dieselbe Weise wie bei den kleinen Kulturen in hängenden Tropfen.

Anstatt des einfachen Plasmas ist als Kulturmedium auch Plasma verwendet worden, das mit $^1/_4$ oder $^2/_5$ destillierten Wassers verdünnt war. Bei gewissen Kulturen (Lewis [27]) wurde auch eine Mischung von 4 Teilen Serum und 1 Teil einer 2proz. Agarlösung verwendet. Carrel und Burrows haben auch besondere Studien über die chemisch-physikalischen Bedingungen des Plasmas gemacht, unter welchen die Kulturen am besten wachsen (15). Sie kamen hierbei zu dem Schlusse,

daß die chemisch-physikalischen Gesetze, welche Loeb für das Wachstum niederer Organe des Kaltblüters aufgestellt hat, auch für die Organe höherstehender Organismen Geltung haben, daß normales Plasma nicht das beste Kulturmedium für Gewebswachstum darstellt, und daß jedes Gewebe wahrscheinlich sein eigenes Medium optimum hat. Hierzu vgl. die Kurve (Fig. 1).

Hadda modifizierte das Medium speziell für die Kultivierung der malignen Tumoren. Die Kultur von Tumoren war bisher daran gescheitert, daß die Tumorstückchen das Plasma nach kurzer Zeit verflüssigten. Durch Mischung artfremder Plasmen

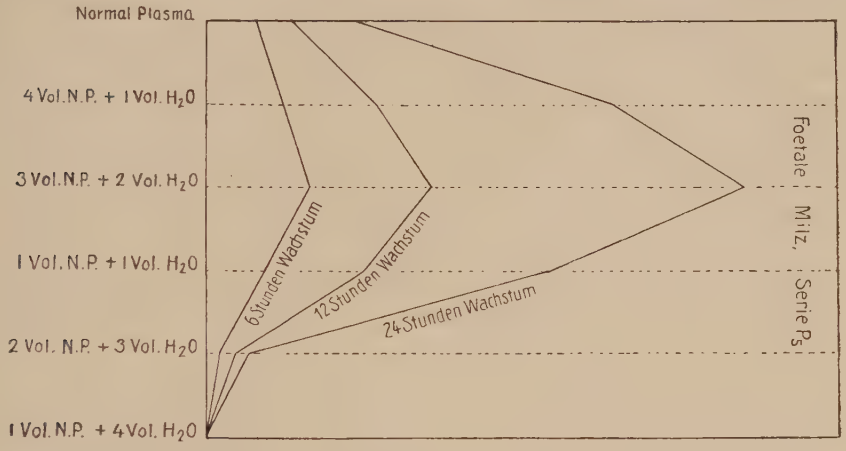

Fig. 1. Die Kurve nach Carrel-Burrows (J. exp. med. XIII Nr. 4) zeigt die Verschiedenheit des Wachstums zu verschiedenen Zeiten nach Anlage der Kultur in normalem und verdünntem Plasma.

konnte Hadda das Eintreten dieser Verflüssigung verhindern (17).

Etwas früher berichteten Lambert und Hanes (26) über die erfolgreiche Züchtung von Gewebsstücken in artfremdem Plasma.

Definition einer Gewebskultur in vitro.

Nach den obigen Ausführungen hätten wir somit unter einer Gewebskultur in vitro ein aus reinem Plasma oder aus Mischungen von Plasma mit destilliertem Wasser oder aus Mischungen von verschiedenen Plasmen bestehenden Nährboden zu verstehen, der

mit kleinen Gewebsstücken beschickt ist. Sie ist nach der Ansicht ihrer Erfinder wesentlich charakterisiert durch ein aktives Wachstum der Zellen von dem ursprünglichen Gewebsstück aus in den Nährboden hinein.

Die bisher zur Kultur verwendeten Gewebsarten und die mit ihnen erzielten Erfolge.

In der Hauptsache ist bisher zu den Kulturversuchen embryonales Gewebe benutzt worden. Harrison arbeitete bei seinen Versuchen mit dem embryonalen Gewebe von Kaltblütern. Er konnte zeigen (20), daß das isolierte Zentralnervensystem eines Froschembryos, in koagulierbare Lymphe gebracht zu einer Zeit, ehe das Auswachsen von peripheren Nerven sichtbar wird, imstande ist, sich über eine längere Periode zu entwickeln und lange Nervenfasern auszusenden. Cajal und Kupfer und His bezweifelten, ob es sich hier wirklich um Nervenfasern handle. Der endgültige Beweis wurde dafür gebracht, als Burrows (5) das Harrisonsche Kulturverfahren auf Gewebe von Warmblüterembryonen ausdehnte und mit Hilfe der Heldschen Hämatoxylinfärbung einwandfrei das Vorhandensein von Neurofibrillen in den Fasern nachwies.

Burrows arbeitete mit Hühnerembryonen von durchschnittlich 60stündiger Bebrütungsdauer. In einer kleinen Tabelle gibt er eine Übersicht über die von ihm kultivierten Gewebe:

Gewebe	Zahl der Präparate	Zahl der Präparate, welche zeigten		
		Muskelzellen	Nervenfaser	Mesenchymzellen
Ganzes Medullarrohr .	64	0		64
Halbes Medullarrohr .	47	0	23	47
Zupfpräparat des Medullarrohrs	27	0	21	27
Herzanlage	40	3	0	36
Muskelstückchen . . .	12	4	0	12

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß Nerven- und Mesenchymzellen die größte Wachstumstendenz besitzen, während Muskelzellen sich nur sehr spärlich entwickeln. Das erste Auftreten aktiver Zelltätigkeit beobachtete Burrows zwischen der 2. und 12. Stunde nach Anlegung der Kultur, jedenfalls nie später als

am Ende des ersten Tages. Stets waren es die Mesenchymzellen, welche zuerst auftraten. Nerven- und Muskelzellen beteiligten sich an dem Vorgang erst vom zweiten Tag ab. Die aktiven Vorgänge an den Zellen erloschen durchschnittlich am sechsten Tag, in einigen Fällen erst am zwölften Tag. Zellteilungsfiguren wurden von Burrows beobachtet, aber niemals sah er den Vorgang sich vor seinen Augen vollziehen. Das ist bei der Größe des beschriebenen Wachstums des ursprünglichen Präparates sowie bei der großen Zahl und der langen Dauer der beobachteten Kulturen recht bemerkenswert. Die Schlüsse, welche Burrows aus seinen Beobachtungen zieht, sind die folgenden:

1. Das Gewebe von Hühnerembryonen kann in Plasma vom erwachsenen Huhn gewonnen außerhalb des Körpers gezüchtet werden.

2. Nervenfasern wachsen von dem Medullarohr, das im Plasma kultiviert wird. Diese Fasern erhalten sich bezüglich der Färbung und ihres histologischen Charakters wie normale embryonale Nervenfasern.

3. Das Wachstum der Fasern kann in diesen Kulturen deutlich beobachtet werden. Sie wachsen durch eigene Aktivität ihres Protoplasmas.

4. Das Wachstum der Mesenchymzellen besteht in einer Wanderung der präexistierenden Gewebszellen und ihrer Vermehrung durch mitotische Teilung.

5. Die Morphologie und Anordnung der Mesenchymzellen sind abhängig von physikalischen Eigenschaften des Plasmaklumpens.

6. Muskelzellen erscheinen als gestreifte Zellen vom Rande des Herzens oder der Herzpartikel.

7. Das embryonale Herz in dieses Medium verpflanzt, schlägt einige Tage oft mit normalem Rhythmus und normaler Kraft.

8. Diese Methode der Gewebskultur gestattet nur das Studium der Histogenese der Zellen und Nervenfasern. Strukturen, den organischen Formationen vergleichbar, wurden niemals beobachtet.

Außer der schon oben hervorgehobenen Tatsache, daß Zellteilung in statu nascendi niemals beobachtet wurde, erscheinen uns aus Gründen, die wir weiter unten ausführen werden, von

diesen Schlußfolgerungen noch bemerkenswert: 1. daß die Anordnung und Struktur der Zellen von physikalischen Eigenschaften des Plasmas abhängig sind und 2. daß organische Formationen niemals beobachtet wurden.

Anknüpfend an diese Arbeiten aus dem Rockefeller Institute hat dann Braus (2, 3) bei der Tagung der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte 1911 einen Vortrag gehalten über die Entstehung der Nervenbahnen. Braus bestätigte hierin die Befunde der amerikanischen Forscher, beschäftigte sich aber im übrigen wesentlich mit der Frage, ob die Neuriten ihren Weg im Körper selbständig wählen oder ob es für sie gewisse Wegweiser gibt. Ein näheres Eingehen auf die hier von Braus aufgeworfene interessante Frage liegt nicht im Rahmen der gegenwärtigen Arbeit. Braus hat dann noch das embryonale Hühnerherz in vitro wachsen sehen, sogar nach dem Aufhören der Pulsation. Genaueres über die Größenzunahme fehlt in den Mitteilungen. Das Wachstum wird erschlossen aus dem Auftreten von Pigmentzellen, welche „dicker werden, amöboide Bewegungen zeigen und sich in toto verschieben". Mit Hilfe von Gewebsstückchen des embryonalen Hühnerherzens berichtet Burrows (6), daß er beobachtet habe, wie isolierte ausgewanderte Syncitialzellen in analoger Weise pulsierten wie die ganze Organanlage, und glaubt damit den direkten Beweis der myogenen Herztheorie erbracht zu haben. Das Wachstum erkennt man nach Burrows „an der Kernteilung und Protoplasmavermehrung der Zellen bzw. des Syncitiums". Ob Burrows sich Kernteilungen vollziehen sah oder nur mitotische Figuren beobachtete, geht aus der Arbeit nicht hervor.

Mit embryonalem Hühnergewebe hat noch Hadda (20) gearbeitet. Seine Kulturen fielen durchschnittlich in 70 Proz. der Fälle positiv aus. Die verwendeten Gewebe waren Haut, Milz, Knorpel, Hornhaut, Niere, Herz, Darmkanal und Gehirn. Die Kulturen von Milz und Haut sollen am schönsten gelungen sein, am seltensten diejenigen des Gehirns. Abgebildet werden eine Knorpelkultur und eine Hautkultur von einem drei Tage alten Embryo.

Im weiteren halten wir es nicht für nötig, im Detail alle Fälle aufzuzählen, in welchem embryonale Kulturen mit Erfolg

angelegt wurden. Es genügen nur die Mitteilungen, daß Carrel und Burrows imstande waren, „fast alle Organe“ von Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen und Hunden zu kultivieren.

Nach den neuesten Mitteilungen war Carrel (11) imstande, embryonale Zellen in Reinkultur zu züchten. Die Kulturen wurden von Primärkulturen vom Bindegewebe genommen, welche über zwei Monate alt waren. Das dabei beobachtete Verfahren läßt sich am besten durch Wiedergabe eines Protokolls von Carrel selbst beschreiben, in welchem er Reinkulturen von Spindelzellen aus einer primären Rundzellenkultur vom Hühnerembryo erzielte. Die Kulturen wurden ähnlich dem Verfahren, wie es bei der Beschreibung der Kulturen mit Gabritschewski-Schale geschildert wurde, angefertigt, d. h. die Kulturen wurden öfters von ihrem ursprünglichen Nährmedium durch Spülung mit Ringerlösung befreit und dann in neues Medium (Plasma) gebracht. Das eine Protokoll Carrels (er teilt nur zwei mit, leider ohne Bilder) ist folgendermaßen:

Experiment II. Primärkultur.

Am 1. IV. 1912 wurde eine Kultur von Bindegewebe, das schon 72 Tage ein sehr aktives Wachstum gezeigt hatte, ausgewählt. Die zentrale Stelle bestand aus einem dichten Gewebe, das von länglichen Zellen umgeben war. An der Peripherie des Plasma waren sehr viele Rundzellen zerstreut. Mit einem Starmesser wurde die zentrale Partie der Kultur entfernt, so daß nur der Kranz von Rundzellen verblieb. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß keine Spindelzellen übrig geblieben waren. Am 3. IV. hatte sich die Zahl der Rundzellen enorm vermehrt, aber es waren keine Spindelzellen aufgetreten.

1. Passage: Am 4. IV. wurde die Kultur in Ringerlösung gewaschen und in neues Plasma gebracht. Am 5. IV. vermehrten sich die Zellen rapide. Am 6. IV. zeigten sich einige Spindelzellen und am 7. IV. war eine große Anzahl von Spindelzellen über das neue Medium zerstreut.

2. Passage: Am 8. IV. wurde die Kultur zum zweiten Male mit Ringerlösung gewaschen und am 9. IV. hatten die Spindelzellen an Zahl stark zugenommen. Am 10. IV. wurde die Kultur in zwei Teile geteilt.

3. Passage: Nach einer dritten Passage am 10. IV. hatte die Dichtigkeit des neuen Gewebes zugenommen.

4. bis 8. Passage: Am 13., 16., 18., 22. und 24. IV.

Die Kulturen bestanden aus einer dichten Masse von Gewebe, aus der ein Kranz länglicher Zellen ausstrahlte. Runde oder amöboide Zellen waren nicht vorhanden.

Wenn diese Experimente Carrels im weiteren eine Bestätigung finden, dann ist die Methode für histogenetische Studien sicherlich sehr wertvoll, insbesondere da man vielleicht einzelne Zellarten in ihrem physiologischen Verhalten wird genauer studieren können. Eins dürfen wir aber zur Beurteilung der Sache nicht außer acht lassen, es waren doch schließlich immer Gewebsfragmente, welche Carrel verpflanzte, und nicht einzelne Zellen. Aber interessant bleibt doch die Tatsache, daß die Umwandlung der Rundzellen in Spindelzellen in vitro beobachtet werden konnte.

Wenn wir somit sehen, daß die mit embryonalem Gewebe ausgeführten Kulturversuche in vitro sehr günstige Resultate bezüglich der Lebensdauer der Zellen und ihrer Lebenserscheinungen gehabt haben, so kann uns das zunächst nicht wundernehmen, weil man dabei Gewebsstücke benützt, die eine starke latente und aktive Wachstumstendenz in sich schließen, für deren Erlöschen nach der Entfernung aus dem Körper kein Grund vorliegt. Denn diese Tendenz ist schließlich nichts Zentrales, sondern eine jeder einzelnen Zelle innewohnende Kraft, die erst mit dem Absterben der Zelle erlischt. Das geht schon aus den viel früher durchgeführten Transplantationsversuchen von kleinen embryonalen Organteilen hervor, die man vor der Transplantation stunden- und tagelang aufbewahrt hatte und die, in den Körper eingebracht, doch noch entwicklungsfähig waren.

Anders hingegen steht es mit den

Kulturen von Geweben erwachsener Tiere.

Zwar sind über Kulturen mit Geweben von „fast sämtlichen Organen erwachsener Tiere“ (Katzen, Hunde, Meerschweinchen und Kaninchen) von Carrel und Burrows sowie von Hadda und Oppel Mitteilungen gemacht worden, aber wir finden die näheren Beschreibungen dieser Kulturen so mangelhaft und so wenig für wirkliches Wachstum beweisend, daß wir gerade hier mit den Nachuntersuchungen glaubten einsetzen zu müssen. Und wie Prausnitz (18) bemerkt, sahen auch wir gerade in der Mitteilung Carrels und Burrows über erfolgreiche Gewebskulturen erwachsener Tiere das eigentliche Novum. Zu kritisieren ist zunächst, daß keiner der Autoren das genaue Alter

der verwendeten Tiere mitteilt; denn es ist gewiß nicht gleichgültig, ob man unter erwachsenen Tieren jugendlich erwachsene oder wirklich alte Tiere versteht. Man sieht von vornherein gar nicht ein, warum das Gewebe erwachsener Tiere, wenn es aus dem Körper herausgeschnitten wird, selbst dann, wenn es in ein geeignetes Nährmaterial unter den denkbar günstigsten physikalischen Bedingungen aufbewahrt wird, wachsen soll im Sinne formativer Organbildung. Es stehen die Behauptungen in Widerspruch mit unseren Beobachtungen bei Wundheilungen an Organen. Und was anders repräsentiert denn ein solches Kulturstückchen eines Organes als eine kleine Wundfläche?

Von Wunden der Milz wissen wir aber z. B. nach L. Meyers und Ceresoles Versuchen (zit. nach Marchand, Prozeß der Wundheilung), daß eine Neubildung in Milzwunden von Milzparenchym ganz ausgeschlossen ist; ferner nach Barths Versuchen, daß eine Regeneration funktionstüchtigen Nierenparenchyms in einer Narbe nicht stattfindet. Dies alles soll nun in vitro anders sein! Und was führen die Autoren zur Begründung eines in vitro stattfindenden Wachstums erwachsener Gewebsstücke an?

Neben der allgemeinen Feststellung, daß es den Autoren gelungen sei, fast alle Gewebe erwachsener Tiere zu züchten, finden wir in der gesamten Literatur nur zwei detaillierte Angaben über die bei diesen Präparaten beobachteten Wachstumserscheinungen. Es ist dies einmal die Arbeit von Carrel und Burrows über Schilddrüsenkulturen in vitro (15). Die andere Arbeit betrifft Nierenkulturen (4). Hier ist gesagt, daß die Kultur von einer Katze „d'âge moyen" stammte. Bei den Schilddrüsenpräparaten fehlen Angaben über das Alter des Tieres, aus dem die abgebildeten Kulturen stammen. Und somit ist es nicht ausgeschlossen, daß auch diese Präparate von jugendlich wachsenden Tieren stammen. Daß die Gewebe nicht embryonaler Natur waren, schließen wir daraus, daß die Tiere zur Entnahme der Gewebsstücke narkotisiert wurden. Freilich sprechen die Autoren an anderer Stelle der Arbeit über Kulturen von einer 6 Tage alten Katze und einem jungen Hunde, und es bleibt die Möglichkeit offen, daß in der Tat jugendliches Gewebe zur Verwendung kam. Wir geben das wesentliche der Mitteilungen über

diese Schilddrüsenkulturen samt Bildern hier wieder. Über die Nierenkulturen lauten die Angaben ganz analog.

Das Schilddrüsenfragment, heißt es, erscheint als ein opaker Körper mit mehr oder weniger scharf begrenzten Rändern und liegt in einem klaren Medium. Unter dem Mikroskop ist es möglich, innerhalb des Fragmentes das Epithelgewebe vom Bindegewebe zu unterscheiden. Die zuerst auftretenden Zellen sind spindelförmig oder polygonal und wandern frei vom Fragment in das Medium. Einzelne dieser polygonalen Zellen haben die Tendenz, kontinuierliche Schichten zu bilden, die sich vom Fragment in das Plasma erstrecken.

Nun kommt aber eine wichtige Mitteilung der Autoren: Wir besitzen zurzeit kein absolut sicheres Kriterium, um die Natur der proliferierten Zellen zu bestimmen, **wir glauben** aber, daß sie aus Bindegewebszellen und Epithelialzellen bestehen. Die früheren Kulturen von Schilddrüsen des Hundes und der Katze zeigten ein Wachsen von nur Bindegewebszellen. Es waren isolierte längliche oder unregelmäßige Zellen mit einem großen klaren Kern mit ein oder zwei Kernkörperchen und vielen Granula, welche entweder um den Kern gruppiert waren oder das Zellprotoplasma ausfüllten. Diese Zellen drangen in das Medium ein, entweder als Einzelzellen oder in Reihen von Zellketten. Schließlich vereinigten sich ihre Fortsätze zu einem offenen Netzwerk. Sie bildeten keine ununterbrochenen Lagen, wie wir das bei Zellen der Epidermis beobachtet haben. Auf der anderen Seite geht ihre Vermehrung rasch vor sich (wie?) und in wenigen Tagen nehmen sie verschiedene Ebenen des Plasmas ein. In manchen Fällen umgaben sie das Fragment konzentrisch und bildeten eine Art dichten Netzwerkes oder eine Art Kapsel. Eine andere Art von Zellen war polygonal und erschien etwas später als die Spindelzellen. Sie zeigten weniger deutliche Umrisse, ein fein granuliertes Protoplasma, welches einen großen, klaren, runden Kern umgab, welcher seinerseits ein oder zwei opake Kernkörperchen enthielt (Fig. 3). Diese Zellen unterscheiden sich dadurch von anderen, daß sie zusammenbleiben und nicht einzeln in das Plasma wandern, daß sie zuweilen tubulöse Gebilde erzeugen (Fig. 4) und manchmal in kontinuierliche Schichten wachsen (Fig. 2). Überdies wachsen

diese Zellen vom Rande des Fragmentes bis in die obersten Schichten des Plasmas und in einer einzigen Ebene. In einem Fall wurde die Tubulusbildung auf die Zirkumferenz eines Schilddrüsenbläschens zurückgeführt, das seine Basis bildete. In einzelnen Fällen war das Wachstum fächerförmig und später entstanden sich verästelnde Tubuli; deshalb glauben wir, daß guter

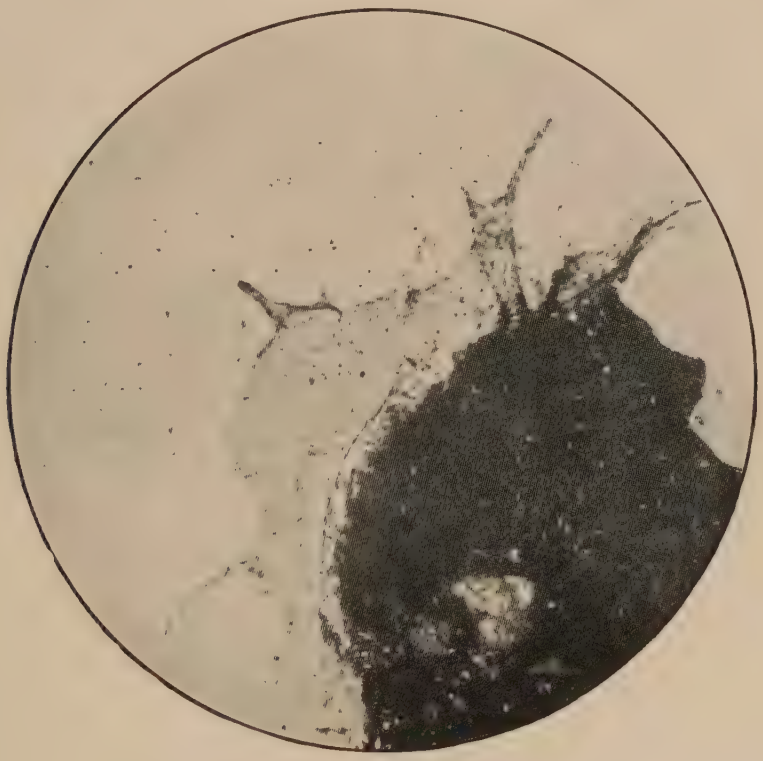

Fig. 2. Nach Carrel-Burrows (Journal of experimental Medicine Vol. XIII.)

Grund vorhanden ist, diesen Zellen epithelialen Charakter zusprechen zu müssen. Schließlich bemerken die Autoren, daß während der Zellproliferation das ursprüngliche Fragment sich aufhellt, so daß Alveoli deutlich sichtbar werden, eine Wirkung, die wahrscheinlich durch die Auswanderung (wandering) von vielen Zellen in das Medium hineinbedingt wird. Bemerkt sei noch, daß bei den Nierenkulturen geschrieben wird, die Zellen

seien in einem Zustand großer Aktivität gewesen und daß man unter ihnen viele karyokinetische Figuren gesehen habe.

Schlußbetrachtungen.

Um nun zu summieren, was Carrel und Burrows als Zeichen aktiven Wachstums an ihren Kulturen erwachsener Tiere

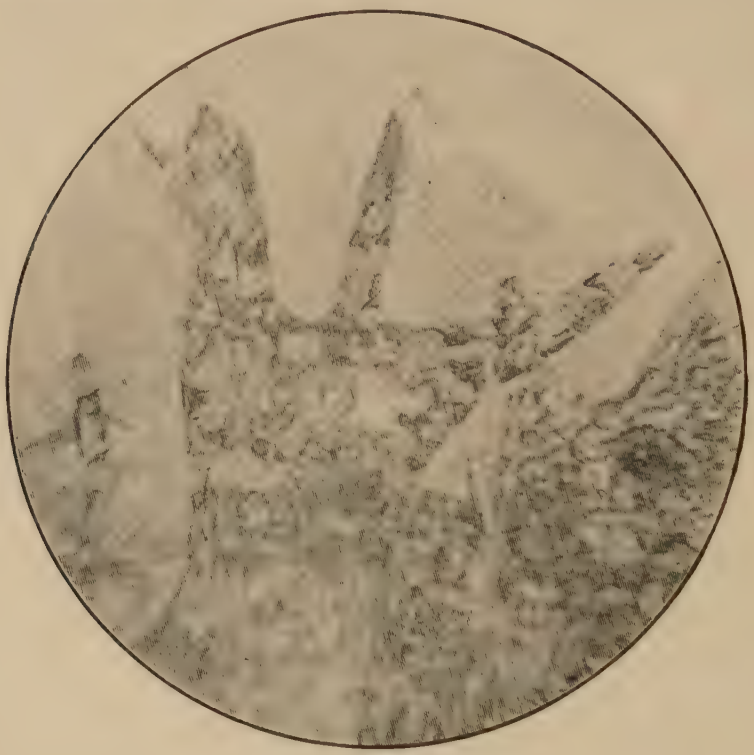

Fig. 3. Zelliradiationen in einer lebenden Kultur, 72 Tage alt, von der Schilddrüse eines Hundes. (Nach Carrel-Burrows.)

angesehen haben, so wäre es, rein makroskopisch betrachtet, die Volumszunahme des Präparates. Ferner das Auftreten von karyokinetischen Zellteilungsfiguren und schließlich das Auftreten von zweierlei Zellformen, von denen sie glauben, daß sie Bindegewebs- und Epithelzellen sind, dabei aber gleichzeitig zugeben müssen, daß sie kein Kriterium besitzen, um dies mit Sicherheit feststellen zu können. Dabei wird aber von Tubulussprossung

bei der Schilddrüse und Niere gesprochen, wonach man meinen sollte, die Differenzierung der Zellen stehe sicher fest.

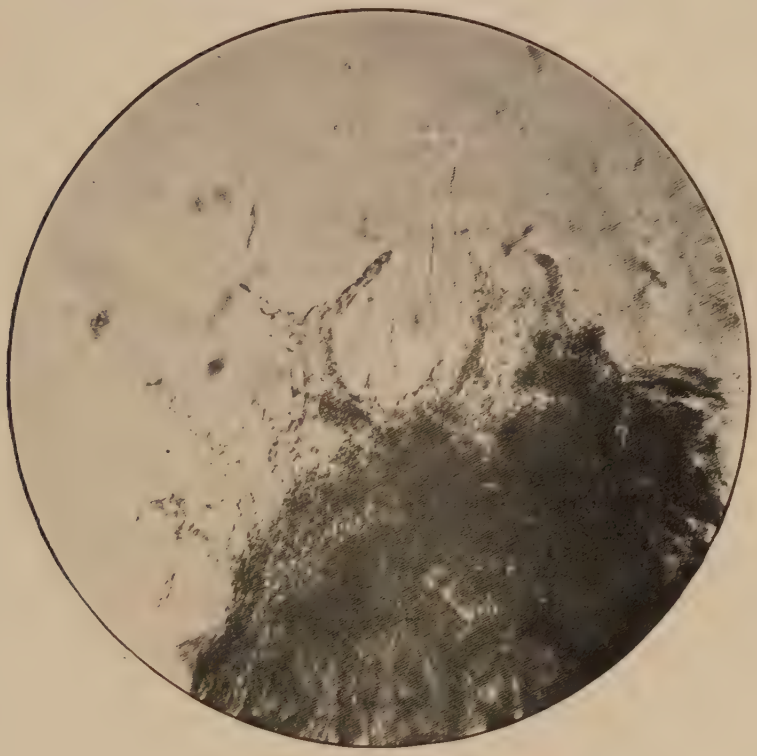

Fig. 4. (Nach Carrel-Burrows.)

Die Beobachtung des Auftretens von epithelialen Zellen an der Peripherie der Fragmente von Nierengewebe erwachsener

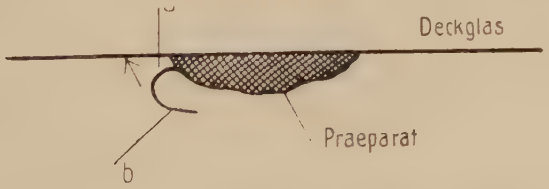

Fig. 5. Schematisch und in übertriebenen Größenverhältnissen gezeichnet.

Tiere steht im Widerspruch mit unseren eigenen Beobachtungen. Wir haben immer nur große Mengen von Zellen nachweisen

können, welche ihrem ganzen Aussehen nach wie lockere oder gelockerte Zwischengewebs- und Wanderzellen aussahen. Wo epitheliale Zellen auftraten, waren sie durch Verschleppung bei der Präparation dahin gekommen. Epitheliale „Sprossungen", wie sie in Fig. 2 und 4 abgebildet sind, haben wir auch beobachtet, aber wir geben ihnen eine andere Deutung, denn ihre Entstehung wurde auch von uns zunächst als Wachstumserscheinung aufgefaßt, später aber bemerkten wir, daß es sich um kleine, frei im Plasma nach unten unter das Primärpräparat geschlagene Ausläufer handelte, die wahrscheinlich durch Strömung im gerinnenden Plasma ganz langsam nach oben in eine höhere Schicht gebracht wurden. Da der dem Rande des Präparates zunächst stehende Teil a (Fig. 5) früher an die Oberfläche kommt und sichtbar wird als b, so entsteht der Eindruck, als wachse der Ausläufer vom Rande aus nach der Peripherie.

Auch bei Leberkulturen haben wir niemals die ausgewanderten Zellen vom epithelialen Charakter gesehen, und niemals entstand ein Gewebe, das einen acinusähnlichen Charakter gehabt hätte; auch hier waren es die gleichen Zellen, welche wir bei der Niere beobachtet und als Wander- und lockere Bindegewebszellen aufgefaßt haben.

Mit Kulturen von Knorpel erlebten wir das Interessante, daß sogar Epiphysenknorpel von ganz jungen Hunden (6 Tage alt) fast gar keine Volumsvermehrung zeigten, und gerade bei diesem Gewebe, dessen große Resistenzfähigkeit von Transplantationsversuchen zur Genüge bekannt ist, hätte man es am ehesten erwarten sollen. Daß die Kultur dieser Gewebe sogar bei jungen Tieren scheitert, ist höchst merkwürdig, aber wir glauben, es beruht eben darauf, daß die sog. Wachstumserscheinungen eben kein wirkliches Wachstum sind, sondern ein Auswandern von Zellen. Da aber der Knorpel ein so festes Gewebe ist, kann natürlich eine Zellwanderung nicht erfolgen. Es ist wohl nicht umsonst, daß alle neueren Studien über Gewebskulturen in vitro fast ausschließlich mit Milzgewebe oder Knochenmark vorgenommen wurden.

Mit dem so widerstandsfähigen Periost haben wir ähnliche Resultate bekommen. Auch hier konnte von einem Wachstum nicht die Rede sein. Nur ein schmaler Hof jener spindelförmigen

und polygonalen Zellen kam zur Auswanderung. Jedoch sind sie im Vergleich zu den bei Milzkulturen beobachteten, rein makroskopisch sichtbaren Vergrößerungen des Stückes sehr minimal. Bei der Milz war die Zellauswanderung eine geradezu enorme. Und nach den Erfahrungen mit diesem Organ glauben wir sagen zu können, daß je lockerer das Gewebe, desto größer die sog. Wachstumserscheinungen sind.

Nach dem Bisherigen müssen wir also entschieden ablehnen, daß bei den Kulturen von erwachsenen Warmblüterorganteilchen ein wirkliches Wachstum eintritt im Sinne einer organischen Formation.

Daß auch das Auftreten von Karyokinesen nicht für dieses formative Wachstum spricht, geht daraus hervor, daß man bekanntlich in fast allen Organen des erwachsenen Körpers schon normalerweise Zellteilungsfiguren findet, insbesondere aber bei jugendlichen Individuen. Konnte Carrel auch in einzelnen Fällen durch Zählung der Zellen ihre Vermehrung feststellen (zit. nach Oppel), so können solche vereinzelte Zählungen doch nur beschränkten Wert haben, um so mehr, wenn man bedenkt, wie groß schon die Fehler bei den in dünnem Ausstrich und unter Benützung einer besonderen Zählkammer erzielten Resultate bei Blutkörperchen sind. Bei Zählung von 200 Feldern der Zeißschen Kammer ist der Fehler noch mindestens 3 Proz.

Wir persönlich haben nur ganz vereinzelt Karyokinesen beobachtet. Selbst Oppel, der sich eingehend mit der bei den Kulturen erwachsener Tiere auftretenden mitotischen Figuren beschäftigt hat, wagt noch keine definitive Entscheidung darüber zu treffen, ob sie im überlebenden Gewebe entstanden sind oder schon vorhanden waren. Auch Hadda, der übrigens sehr dazu neigt, die beobachteten Vorgänge bei den Kulturen als wirkliches Wachstum anzusprechen, bemerkt ausdrücklich, „daß mitunter, aber nicht sehr häufig, Kernteilungsfiguren sichtbar sind".

Hadda konnte gleich dem Verfasser niemals das von Carrel beschriebene Wachstum im Sinne des primären Gewebsstückes, also Tubulussprossung bei Niere und Schilddrüse beobachten, sondern sagt ausdrücklich, daß das Wachstum ein regelloses sei.

Auch Prausnitz sagt nicht nur, daß er karyokinetische Figuren nur äußerst selten beobachtet habe, sondern bestreitet

auch entschieden das Auftreten von spezifischen Zellarten in der Umgebung der Primärpräparate und ist geneigt, die neuauftretenden Zellen als amöboide Bindegewebszellen aufzufassen. Das unregelmäßig Polygonale der beobachteten Zellen deckt sich auch mit unseren Kenntnissen von den Bindegewebszellen, von denen Stöhr sagt, daß ihre Form überhaupt nichts Charakteristisches hat und daß ihre Ähnlichkeit mit Epithelzellen besonders dann eine vollkommene ist, wenn sie in Gruppen beisammen liegen. Damit wird sich vielleicht das große Dilemma aller Autoren erklären, die nicht recht wissen, wo sie die neuauftretenden Zellen histologisch eingruppieren sollen.

In Übereinstimmung mit Prausnitz und Jolly konnten auch wir an den am Rande aufgetretenen Zellen schon bald nach ihrer Auswanderung degenerative Erscheinungen nachweisen in der Form von Fetttröpfchen und feinen Granulationen. Von keiner Seite ist also bis jetzt der Nachweis eines echten Wachstums von Gewebskulturen erwachsener Tiere erbracht worden. Vielmehr deutet alles auf einen mehr passiven Prozeß hin, bei welchem vielleicht die lockeren Zellen bei der Gerinnung des Plasmas mechanisch aus dem Gewebe herausgepreßt werden, vielleicht aber auch fermentative Prozesse, vielleicht auch rein osmotische Prozesse im Spiele sind. Wir erinnern hierbei an das, was Braus über die Struktur des koagulierbaren Blutplasmas schreibt, in welchem Kulturen aufgezogen wurden. Er konnte in Gemeinschaft mit W. Groß beobachten, wie sich die Fibrinfäden zu feinen Maschen anordnen und dazwischen helle Straßen ziehen, welche die wandernden Mesenchymzellen hinter sich lassen. Schließlich gibt ja auch Burrows selbst zu, daß die Anordnung und Struktur der Zellen von physikalischen Vorgängen abhängig sei, denn er sah, wie die Zellform direkt beeinflußt wurde durch die Architektur des Fibrins. Überall also Unklarheiten und Unsicherheiten, und dennoch spricht man von Wachstum.

Mit den Kulturen maligner Tumoren hat man bis jetzt eigentlich nur mit Tiertumoren Erfolg gehabt. Zwar berichteten Carrel und Burrows (12), daß es ihnen gelungen sei, ein Stück von einem menschlichen Spindelzellensarkom zu züchten, aber ihre Angaben sind so knapp und ungenau, daß man sich

keine klare Vorstellung von dem Vorgang machen kann. Sie schreiben vom Auswandern spindelförmiger Zellen und von einzelnen Zellstadien, wo sie sich eine Zelle unter dem Mikroskop vergrößern sahen, das ist aber auch alles. Hadda legte Kulturen von nicht weniger als acht Mammacarcinomen und zwei Riesenzellensarkomen vom Menschen an, aber alle Versuche fielen negativ aus.

Über die Kulturen mit Tiertumoren ist schon mehr gearbeitet worden, so mit dem Ehrlichschen Rattensarkom, mit Rons' Hühnersarkom und mit Mäusetumoren. Auch sie sollen gewachsen sein. Zur Nachprüfung dieser Versuche sind wir leider nicht imstande gewesen und enthalten uns daher auch einer weiteren Kritik.

Auch ein Eingehen auf die neuerdings von Hadda und Rosenthal (19) sowie von Carrel (8), Lambert und Hanes (24) aufgestellten Versuche über Antikörperbildung in den Kulturen in vitro halten wir für nicht erforderlich, da sie wohl ein Überleben und physiologisches Funktionieren der Gewebsfragmente beweisen, aber nichts mit dem Wachstum desselben zu tun haben.

Die Bildung von Fremdkörper-Riesenzellen in den Gewebskulturen, die Lambert beschrieben hat, ist sehr interessant, aber für das Wachstum auch nicht beweisend.

Zum Schlusse möchten wir uns zu der Äußerung von Jolly bekennen, der seine Ansicht über das Wachstum von Gewebszellen, wie sie Carrel und Burrows beschrieben haben, folgendermaßen zusammenfaßt:

En resumé, les expériences de MM. Carrel et Burrows ne sont pas absolument nouvelles. Elles se relient à tout un ordre de recherches antérieures dans lesquelles des résultats fort intéressants avaient déjà été obtenus. Jusqu'à present. MM. Carrel et Burrows ne semblent avoir démontré que des phénomènes de survie. Certaines de leurs descriptions semblent même se rapporter à des phénomènes de nécrobiose. Dans certains tissus, in vitro, des multiplications cellulaires paraissent pouvoir continuer quelque temps a s'effectuer, ce qui état connu; mais entre cet effort ultime de quelques cellules et une „culture"

à dévéloppement continué et progressif, il y a un abîme, qui sera peut-être comblé un jour. Pour le moment c'est un abus de langage que d'appeler du nom de „cultures" les résultats obtenus.

Literaturverzeichnis.

1. Braus, H. Münchn. med. Wochenschr. 1911.
2. Derselbe. Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte 1911.
3. Derselbe. Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte 1911. Wiener med. Wochenschr. 1911, Nr. 44.
4. Burrows. Compt. rend. soc. de biol. 1910, LXIX. Journ. am. med. Assoc. 1910, Journ. exp. Zool. 1911, X.
5. Derselbe. Journ. exp. Zool. 1911, X, Nr. 1.
6. Derselbe. Münchn. med. Wochenschr. 1912, Nr. 27.
7. Carrel. Journ. exper. Med. 1910, XII.
8. Derselbe. Berliner klin. Wochenschr. 1912, Nr. 12.
9. Derselbe. Journ. exp. Med. 1912, X, 4.
10. Derselbe. Journ. exp. Med. 1912, XV, 5.
11. Derselbe. Journ. exp. Med. 1912, XVI, 2.
12. Carrel u. Burrows. Journ. exp. Med. 1912, XV, 3.
13. Dieselben. Journ. am. med. Assoc. 1911, LVI.
14. Dieselben. Journ. exp. Med. 1911, XIII, Nr. 3.
15. Dieselben. Journ. exp. Med. 1911, XIII, Nr. 4 (3 Arbeiten).
16. Edward u. Ruth. Journ. exp. Med. 1911, XIII, Nr. 4.
17. Hadda. Berliner klin. Wochenschr. 1912, Nr. 1.
18. Hadda, Pfeiffer, Prausnitz (Behne). Berliner klin. Wochenschrift 1912, Nr. 5.
19. Hadda u. Rosenthal. Berliner klin. Wochenschrift 1912, Nr. 35.
20. Harrison, R. G. Proc. soc. exp. Biol. and Med. 1907, IV. Lectures 1907—1908. Anat. rec. 1908, II. Journ. exp. Zool. 1910, IX.
21. Ingebrigsten. Journ. exp. Med. 1912, XV, 4.
22. Jolly. Compt. rend. de la Soc. de biol. 1910, II, Bd. 69.
23. Derselbe. Compt. rend. Soc. de biol. 1910, LXIX.
24. Lambert u. Hanes. Journ. exp. Med., XIV, Nr. 2.
25. Dieselben. Journ. am. med. Assoc. 1911, LVI.
26. Dieselben. Journ. exp. Med. 1911, XIV, 2.
27. Levis, M. R., u. W. H. Johns Hopkins Hospital Bulletin 1911, XXII.
28. Loeb, Leo, Über die Entstehung von Bindegewebe, Leukocyten und roten Blutkörperchen aus Epithel und über eine Methode, isolierte Gewebsteile zu züchten. Chicago 1897. Arch. f. d. Entwicklungsgesch. d. Organe 1902, 13.
29. Oppel, Albert. Anat. Anzeiger 1912, Nr. 17/18.
30. Derselbe. Arch. f. Entwicklungsmechanik der Org., Bd. 34, H. 1.
31. Rons. Compt. rend. soc. de biol. 1910, LXIX.
32. Volpino. Journ. am. med. Assoc. 1911, LVI.

Lebenslauf.

Ich, Anton Dilger, bin geboren am 13. Februar 1884 in Front Royal Va U. S. A. Mein Vater war der badische Artillerie-Oberleutnant und spätere amerikanische General Hubert Dilger, meine Mutter, Elisabeth geb. Tiedemann. Nach Absolvierung des humanistischen Gymnasiums zu Bensheim a. d. B. im Frühjahr 1903 wurde ich im Sommer-Semester des gleichen Jahres in Heidelberg in der medizinischen Fakultät immatrikuliert, bestand hier im Sommer 1905 die ärztliche Vorprüfung, war danach im Winter-Semester 1905/6 in München immatrikuliert und kehrte für den Sommer 1906 nach Heidelberg zurück, wo ich im Sommer 1908 die ärztliche Hauptprüfung bestand. Seit Oktober 1909 bin ich Assistent an der chirurgischen Klinik Heidelberg.

Druck von August Pries in Leipzig.